

ANALYZING ELEMENT

Patent Number: JP57101760
Publication date: 1982-06-24
Inventor(s): KAMIYAMA MIKIO; others: 03
Applicant(s): KONISHIROKU PHOTO IND CO LTD
Requested Patent: JP57101760
Application Number: JP19800179613 19801217
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N31/22; G01N21/75
EC Classification:
Equivalents: JP1592843C, JP2019903B

Abstract

PURPOSE: To obtain a particle form structure layer in which particle units are combined together to form a firm structure, by a method wherein reactive groups among particle units react to each other via low-molecular compound at a combination part of the particle units to form a three-dimentional grating.

CONSTITUTION: An analyzing element has a particle combination substance being of a non-swelling three-dimentional grating having a mutual connecting gap in a gap rate of 25-85% at one end of a liquid-nonpenetrating and light-transmitting supporter. The particle combination substance 1 is constituted such that thermal steady organic high-molecular polymer particles 2, which measures 1-350μ, having a reactive group, are checmically combined with each other at a combination part with a reaction group via a low-molecular compound. A resultant mutual connecting gap structure 4 is prevented from being blocked with a large amount of a high-molecular weight material being dissolved and dispersed in a sample. Additionally, the structure has a sufficient strength to hold an outer shape and structure against a physical external force.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報 (A) 昭57-101760

⑩ Int. Cl.³
G 01 N 31/22
21/75 識別記号 121 厅内整理番号 6514-2G
6422-2G ⑬ 公開 昭和57年(1982)6月24日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 17 頁)

⑭ 分析素子

⑪ 特願 昭55-179613
⑫ 出願 昭55(1980)12月17日
⑬ 発明者 神山幹夫
日野市さくら町1番地小西六写
真工業株式会社内
⑭ 発明者 菊川省三
日野市さくら町1番地小西六写
真工業株式会社内

⑪ 発明者 岡庭憲一郎
日野市さくら町1番地小西六写
真工業株式会社内
⑫ 発明者 玉城喜代志
日野市さくら町1番地小西六写
真工業株式会社内
⑬ 出願人 小西六写真工業株式会社
東京都新宿区西新宿1丁目26番
2号
⑭ 代理人 桑原義美

明細書の添付(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

分析素子

2. 特許請求の範囲

液体不浸透性、光透過性支持体の一側に位置した相互連絡空隙構造層を有する、流体を分析する分析素子において、該相互連絡空隙構造層は該流体の輸送を可能とする空隙率が25ないし85%の相互連絡空隙を有する非膨潤性三次元格子である粒子結合体からなり、該粒子結合体は該流体に非膨潤性、不浸透性であり、かつ反応性基を有するサイズ1乃至350ミクロンの熱安定性有機高分子重合体粒子単位同志が結合部分において、該反応性基により、低分子化合物を介して化学結合したものであることを特徴とする分析素子。

3. 発明の詳細な説明

本発明は一般に分析化学、特に流体中の予め定められた特定成分を分析する分析素子に関し、更に詳しくは生物学的流体試料中の特定成分を分析するための定量分析素子に関する。

従来、流体試料中の成分を分析する方法は多數

開発がなされてきた。例えば自動定量分析装置があげられる。これらは特に病院の臨床検査室等で多用され有用である。このような自動分析装置は例えば米国特許第2797149号に記載の如く、連続流れ分析に基づき試料、-希釈剤、及び分析試薬を一緒に混合し、これを分析装置に移送する方法が用いられている。

しかしながらこのようない連続自動分析装置は、複雑かつ高価であり熟練した操作技術者を必要とし、又分析操作の後には必ず繰返し洗浄操作が必要とされ、これを行なうに多大な時間と労力を消費し、かつこれらの廃液は必然的に環境汚染の問題を起こすという欠点を有する。

一方、前述の浴液を用いる分析系に対し、乾燥系の化学(ドライケミストリイ)を用いる分析系がある。これらは試験紙又は試験片と呼ばれ、例えば米国特許第3050373号、あるいは同第3061523号に記載の如く、沪紙等の吸収性担体に分析試薬溶液を含浸させ、乾燥した形で提供される。この試験片は液体である流体試料中へ投擲した後

引き上げ、試験片の色変化又は濃度変化を肉眼判定、又は濃度計等の機器の如きもので判定するものである。

これら試験片はその取扱が簡便であり、かつ直ちに結果が得られることで有用である。しかしながら吸収性担体中に試薬を担持して成るこれら試験片は、種々の重大な欠点を有し、その為用途は定性分析又は半定量分析の範囲にとどまつている、これらの欠点を克服する為に、米国特許第

3992158号に記載されているような分析粒子が開発された。これは透明支持体上に分析試薬を含有した試薬層及び、等方的に多孔性の非纖維質多孔性粒子からなる拡散層を積層したものである。

前記特許の拡散層は

- (1) 流体試料を単位面積当たり一定容量に試薬層内に均一に配布し
- (2) 流体試料中の分析反応を阻害する物質又は要因を除去し
- (3) 分光光度分析を行う際に支持体を経て透過する測定光を反射するバックグランド作用を行なう。

という三つの機能を有するとされている。

同上特許には、珪藻土粒子、白色顔料、又は不活性白色ガラスビーズをセルロースエステル等のポリマー素材結合剤を用いて形成した多孔性皮膜が記載されている。

これらは前記の拡散層に要求される三つの機能を有しているとされている。しかしながらこれらの皮膜は本質的に脆弱を強調しか有することがでできず、破損の度合が大きく安定して供給する事が困難であり、血球の如き細胞又は大複合蛋白質を含む流体試料を適用した場合、孔の詰まり、もしくは不均一透過の如き不整の現象を起こすという欠点を有している。又、製造の面からも塗布の条件をきびしくコントロールする必要があり、それをはすれば一定の空隙率を得る事は困難である。更に微結晶コロイド粒子、即ちセルロース微結晶の如き粒状物質水性流体試料の存在下で影響する傾向にある。従つて、上記材料から製造された多孔性粒状構造層は流体試料の適用により、層内の空隙を部分的又は完全に閉塞し、流体の流れ

を著しく阻害する欠点を有する。又、同号特許の別の範囲として不活性なガラスビーズ又は樹脂の如き非粘着性粒子をゼラチン又はポリビニルアルコールの如き親水性コロイド粘着剤として用いて多孔性構造体を形成するものが挙げられている。

しかしながらこれは、上記粘着剤の如きによつて多孔性層の空隙率は変化し十分な接着強度を有する程既に親水性コロイドを添加すると空隙率は減少し、流体試料の流れを阻害し、又、逆に少なくすると該層構造体をとりえない程脆弱なものとなる。又更に接着力となる親水性コロイドは、水溶性であるという理由により水性流体試料が存在する場合に接着強度の更なる低下を起こす欠点を有する。又、同号特許に開示されている多孔性層は前記流体試料中に含まれる多くの大複合巨大分子及び、細胞が孔内に詰り易く、流体の流れを妨害しがちであるという欠点を有している。

又、米国特許第2297247号及び同第2745141号には粒子を熱軟化もしくは、溶媒軟化し易めた

凝集粒子層が開示されている。この層においては、粒子は相互接触点で互いに融合している。この事は、同上特許で開示されている凝集粒子層を構成する粒子が熱軟化もしくは溶媒軟化により、変形を起こし易く所望の粒子間空隙を減少もしくは全くなくしてしまう欠点を有していることを示している。米国特許第2297248号には、粒子を‘適当なセメント’で接着させた粒状構造物であるフィルター要素が開示されている。しかしながら、これも同様に接着剤の量により粒子間空隙をうめ易く、それ故大複合巨大分子や細胞により詰まりやすく、前記流体の流れを阻害しやすいかりでなくこれを全く含まない流体の流れも遮断されるという欠点を有している。更には、特開昭55-90859号において非膨潤性、液体不浸透性の熱安定性有機ポリマー粒子を該ポリマー粒子とは異種のポリマーを接着剤として用いて接着した凝集三次元格子の多孔性粒状構造物が開示されている。

上記特許も、前述の特許と同様に熱安定性の低いを有する、ガラス転移温度(T_g)が低い接着剤

ポリマーをTg以下で熱軟化させ、熱安定性有機ポリマー間を接着し相互連絡空間を有する粒状構造物を形成するものである。従つて上記特許記載の粒状構造物を形成するのに使用する接着剤の量が多い場合には空隙率を減少させ、一方少なすぎる場合には充分な接着強度が得られないため、規定量の上記接着剤を用い、その全てを上記熱安定性ポリマー粒子間の所望の位置に配置させなければならず、一定の空隙率を制御することが困難である。又、接着剤の熱軟化による変形によつて不活性ビーズを粘着結合させているだけで接着強度が低いという欠点を有する。

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、下記構成を有する分析素子を用いる事により上記欠点を克服することができた。

即ち本発明の分析素子は液体不浸透性、光透過性支持体の一側に位置した相互連絡空隙構造層を有する。流体を分析する分析素子において、該相互連絡空隙構造層は該流体の輸送を可能とする空隙率が25乃至85%の相互連絡空隙を有する非膨

脅性三次元格子である粒子結合体からなり、該粒子結合体は該流体に非膨脹性、不浸透性であり、かつ反応性基を有するサイズ1乃至350ミクロンの熱安定性有機高分子重合体粒子単位同志が結合部分において、該反応性基により、低分子化合物を介して化学結合したものであることを特徴とする。

本発明の粒子結合体からなる相互連絡空隙構造層は流体試料、特に生物学的流体試料中に溶解又は分散した多くの高分子量物質、赤血球等の血球類、又は流体分析操作に用いる相互作用性組成物を空隙構造内に詰りを生じることなく、又は流体輸送に実質的に妨害することなく容易に収容又は分離済過することが可能である。

本発明の分析素子は分析対象物（以下被検体と称す）である低分子量もしくは高分子量物質のいづれかを含む液体に対して非常に有効な拡散機能を有することができる。即ち、これらの素子は様々な被検体を含む通用流体試料を容易に収容可能であり分析素子内に均一に分布可能であり、計量可

能であり、更に容易に輸送可能である粒子状構造層を有する。

本発明の反応性基を有する熱安定性高分子重合体粒子単位から形成される粒子結合体相互連絡空隙構造層は、粒子単位の結合部分において粒子単位同志の反応性基が低分子化合物を介して、互いに反応を起して三次元格子を生成したものであり、粒子単位同志は、強度を化学結合によつて結合されたものである。従つて、該構造層の強度は充分に物理的外力に対して外形、構造を保持しうるに充分なものであることは明白である。

上記高分子重合体粒子単位は、そのサイズが好ましくは約1乃至約350ミクロンであり、これら粒子単位は相互連絡空隙を含む三次元格子である粒子結合体を形成し、かつ空隙体積の合計が約25乃至85%である。

本発明の流体不浸透性、非膨脹性粒子結合体は前記液体が実質的に浸透しないことを示し、かつ非膨脹性とは液体に接触した時に、実質的に膨脹性を示さないものをいう。この膨脹性の度合は、

例えば A.Green 及び G.J.P.Levenson 著 Journal of Photographic Science 第20巻、第205頁（1972年）に示される型の膨脹計を使用し、所望の液体下で測定することができる。即ち、ポリエチレンテレフタレート支持体の如き適当な支持体上に、(1)、粒子単位材料として用いることを考慮中の高分子重合体の自己支持性フィルムが、又は、(2)、50乃至350ミクロンの範囲内に乾燥膜層の層を形成し、前記膨脹度計を用い、該フィルム又は層を38℃の液浴に約2.5分間浸すことにより生じるフィルム又は層の厚さの増加パーセントを測定する。これらの方法により測定された膨脹度が約20%未満、好ましくは約10%未満のものが好ましい高分子重合体粒子単位材料として用いることができる。

本発明の粒子結合体を構成する高分子重合体粒子単位のサイズは上述の範囲内で広く可変であり、種々のサイズのものを混合して用いることも可能であるが好ましい態様ではこれら粒子単位は実質的に均一サイズである。好ましくは粒子単位表面

は曲面状であり、より好ましくは実質的に球状である。有機高分子重合体粒子単位のサイズによりある程度相互連結空隙構造層に含まれる空隙のサイズが規制される。6乃至8ミクロンの範囲にある赤血球の如く完全に細胞状の構造のものを含む液体試料を適用するに好ましい態様では、比較的大きいサイズの粒子単位を用いる。このような場合20乃至300ミクロン好ましくは20乃至150ミクロンのサイズのものを用いることが可能である。

生物源の巨大分子のような大複合分子、例えばリボ蛋白質、抗原等の輸送に関する場合1~100ミクロン好ましくは2乃至50ミクロン、好ましくは2乃至20ミクロンのオーダーのサイズ範囲である。更に小さい分子サイズの被検体、例えばグルコース分子、尿酸分子等を含む水性液体の場合は1乃至30ミクロンの範囲内のサイズの粒子単位を用いることができる。

本発明における低分子化合物を介した隣接粒子単位間の化学結合は、同種の反応性基を有する隣接粒子単位と低分子化合物、例えば、エポキシ基

を有する粒子単位とジアミノ化合物との反応により形成されてもよいし、異種の反応性基を有する粒子単位と低分子化合物、例えばアミノ基及びカルボキシル基を各々別々に有する粒子単位と、ビスホルミル化合物との反応により形成されてもよい。又各粒子単位は二種以上の反応性基を有していてもよい。反応性基を低分子化合物を介して化学結合させる為には、必要に応じて加熱してもよいし、触媒を用いても良い。反応性基を有する粒子単位は例えば、反応性基又はその前駆体を有する単量体を単独重合又は共重合することにより得ることができる。二種以上の反応性基を有する粒子単位は、例えば異種の反応性基又はその前駆体を有する単量体を共重合することにより得ることができる。反応性基の前駆体を有する単量体を用いた場合には、例えば粒子単位を形成した後に、例えば加水分解等により反応性基を有する粒子単位とすることができます。本発明において反応性基を有する単量体単位は、重合体粒子単位中約0.1乃至約30重量パーセントであることが好ましく、

特に0.5乃至20パーセントであることが好ましい。

上述の同種の反応性基を有する隣接粒子単位同士の反応により、化学結合を形成するのに適した反応性基を有する単量体としては、例えば、エポキシ基を有する単量体、アジリジル基を有する単量体、ホルミル基を有する単量体、ヒドロキシメチル基を有する単量体、イソシアナート基を有する単量体、チオール基を有する単量体、カルバモイル基を有する単量体、カルボキシル基を有する単量体、ハロエチルスルホニル基を有する単量体、ビニルスルホニル基を有する単量体、活性メチレン含有基を単量体、カルボキシメトキシメチル基を有する単量体、トリアジン環基を有する単量体、カルバモイル基を有する単量体、アミノ基を有する単量体、ヒドロキシル基を有する単量体が挙げられる。

エポキシ基を有する単量体としては、例えば、クリシジルアクリレート、クリシジルメタアクリレート、アリルクリシジルエーテル、4-ビニルシクロヘキサンモノエポキサイド等が挙げられる

アジリジル基を有する単量体としては、例えば、アジリジルエチルメタアクリレート、1-エチレンスルホニルアジリジン、1-エチレンカルボニルアジリジン、アジリジルエチルアクリレートが挙げられる。ホルミル基を有する単量体としては、例えば、アクロレイン、メタアクロレイン等が挙げられる。ヒドロキシメチル基を有する単量体としては、例えば、N-メチロールアクリルアミド、N-メチロールメタアクリルアミド、N-メチロールジアセトンアクリルアミド等が挙げられる。イソシアナート基を有する単量体としては、例えば、ビニルイソシアナート、アリルイソシアナートが挙げられる。チオール基を有する単量体としては、例えば、ビニルチオール、D-チオールスチレン、M-チオールスチレン、ビニルベンジルチオール及びこれらのアセチル体等が挙げられる。

カルバモイル基を含む単量体としては、例えばアクリルアミド、メタアクリルアミド、アレインアミド、ジアセトンアクリルアミド等が挙げられる。カルボキシル基を有する単量体としては、例え

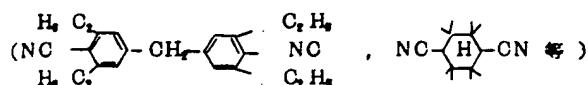
は、アクリル酸、メタアクリル酸、マレイン酸、イタコン酸半エステル、マレイン酸半エステル等が挙げられる。ハロエチルスルホニル基を有する单量体としては、例えば、クロルエチルスルホニルエチルメタアクリレート、プロモエチルスルホニルエチルアクリレート、ビニルスルホニル基を有する。アミノ基を有する单量体としては例えばアミノステレン、N,N-ジメチルアミノエチルアクリレート、N,N-ジメチルアミノエチルメタアクリレート。ヒドロキシル基を有する单量体としては、例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタアクリレート。活性メチレン含有基を有する单量体としては、例えば、アクリロイルアセトン、メタアクリロイルアセトン、アセトアセトキシエチルアクリレート。

上述の反応性基を有する单量体は、種々の低分子化合物と化学結合を起しめる事が可能である。

例えば、写真分野において慣用のセラチンの硬膜剤が、前述の低分子化合物として用いることが可能である。

更に、エポキシ基を有する半量体と化学結合する低分子化合物としては、例えば、ビスフェノール化合物（ビスフェノールA等）、ジカルボン酸化合物（コハク酸等）、アミノ化合物（メタンジアミン、ジエチレントリアミン、エチレンジアミン、ローハキシルアミン等）が挙げられる。

アジリジル基を有する单量体も、同様に前述の低分子化合物を用いることが可能である。カルボキシル基を有する单量体と化学結合する低分子化合物としては、ビスエポキシ化合物（例えば、ヘキサメチレンビスオキシラン等）、エピハロヒドリン化合物（エピクロルヒドリン等）、グリコール化物（エチレングリコール等）、ジヒドロキシ化合物（ $\text{HOCH}_2\text{COOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOCH}_2\text{OH}$ 等）分子量70乃至400のジニトリル化合物、



又、多価金属塩、例えば Al, Ba, Ca, Sr, Mg 及び Pb の酸化物、水酸化物及び酢酸塩も、有用

に用いることが可能である。

活性メチレン含有基を有する单量体と化学結合をする低分子化合物としては、ジアルデヒド化合物（例えば、グルタルアルデヒド等）が有利に用いられる事が可能である。

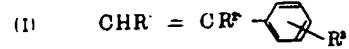
アミノ基を有する单量体と化学結合する低分子化合物としては、例えば、アルデヒド及びジアルデヒド化合物（ムコクロル酸、グルタルアルデヒド等）、ジイソシアナート化合物（ヘキサメチレンジイソシアナート等）、ビスエポキシン化合物（ヘキサメチレンビスオキシラン等）ジスルホニルクロリド化合物（フエノール-2,4-ジスルホニルクロリド等）が用いる事が可能である。

本発明の反応性基を有する単量体と、該単量体と化学結合する低分子化合物は、各々同志の反応性及び他の目的により広範な範囲の組合せの中から、その組合せを選定選択すべきであり、例えば D.H.Solomon 著、The Chemistry of Organic Film Formers、^{と Sons,} John Wiley Inc New York (1967) に記載のものも有利に用いることができるが、上

述の本発明の反応性基を有する単量体と該単量体と化学結合する低分子化合物の組合せは、好ましい態様の一例であつて、本発明を何ら限定するものではない。

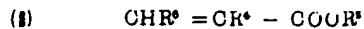
本発明の低分子化合物は、本発明の重合体粒子単位中の反応性基を有する半導体に対して、約2倍モル乃至0.005倍モル用いることが可能であるが、好ましくは約1.5倍モル乃至0.01倍モルである。

前述の反応性基を有する単量体と共重合する他の好ましい単量体の例を以下に示す。



(式中 R' 、 R'' は同一であつても異なつてもよく、水素原子、ハロゲン原子、1乃至10個の炭素原子を有する置換もしくは未置換のアミノ基を含まないアルキル基、又はアリール基の如き非障害性置換基を表わし、 R^1 は水素原子、ハロゲン原子、又は炭素原子1乃至10個の置換、もしくは未置換のアミノ基を含まぬ脂肪族基、もしくは芳香族基を表わす。)

脂肪族基及び芳香族基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基が挙げられる。式(I)で示される単量体としては、例えば、ステレン、ビニルトルエン、ビニルベンジルクロリード、1-ブチルステレン等がある。



(式中 R^a は式(I)における R^b と同様であり、 R^b は水素原子又はメチル基、 R^c は置換又は未置換のそれぞれの炭素原子 1 乃至 10 個を有するアリール基、アルキル基、アルカール基及びアラルキル基)

(1) アクリロニトリル、メタアクリロニトリルの如き、重合性不飽和ニトリル単量体。

(2) ジビニルベンゼン、N,N-メチレンビス(アクリルアミド)、エチレンジアクリレート及びエチレンジメタアクリレートの如き、二つの付加重合性基を有する粒子内架橋性単量体。

これらの単量体及び前記反応性基を有する単量体を適宜組合わせて共重合させることで、本発明

の高分子重合体粒子単位を構成することが可能である。粒子単位は、これらの単量体単位を(I)、(II)及び(III)のものについてはそれぞれ 0 乃至 99.5 重量パーセント、例のものについては 0 乃至 10 重量パーセント、好ましくは 0 乃至 5 重量パーセント含有することが好ましい。

本発明の粒子結合体を形成する高分子重合体粒子単位の代表的具体例を以下に示すが、これによつて本発明が限定されるものではない。又各例示化合物の後の〔 〕内は重合反応に用いた単量体の重量パーセントを示す。

例示化合物

(1)

ポリ(ステレン-コーグリシジルメタアクリレート) (90/10)

(2)

ポリ(ステレン-コーゲメチルアクリレート-コーグリシジルメタアクリレート) (80/15/5)

(3)

ポリ(ステレン-コーコーブチルメタアクリレート-コーグリシジルメタアクリレート) (75/

15/10)。

(4)

ポリ(ステレン-コーピニルベンジルクロリド-コーグリシジルメタアクリレート) (80/10/10)

(5)

ポリ(ステレン-コージビニルベンゼン-コーグリシジルアクリレート) (90/2/8)

(6)

ポリ(p-ビニルトルエン-コーグリシジルメタアクリレート) (90/10)

(7)

ポリ(メタアクリレート-コーグリシジルメタアクリレート) (80/20)

(8)

ポリ(ステレン-コ- N,N-ジメチルアミノエチルメタアクリレート) (95/5)

(9)

ポリ(ステレン-コーアジリジルエチルメタアクリレート) (95/5)

(10)

ポリ(ステレン-コーゲメチルアクリレート-コーアクロレイン) (90/5/5)

(11)

ポリ(ステレン-コーアクリルアミド) (95/5)

(12)

ポリ(ステレン-コ-ビニルチオール) (95/5)

(13)

ポリ(ステレン-コ-メチロール化アクリルアミド) (95/5)

(14)

ポリ(ステレン-コ-1-ブチルアクリレート-グリシジルメタアクリレート) (95/5/5)

(15)

ポリ(ステレン-コ-ビニルイソシアネート) (95/5)

(16)

ポリ(メチルアクリレート-コ-ステレン-コ- N-メチロールアクリルアミド) (50/35/15)

(17)

ポリ(ステレン-コーグリシジルメタアクリレ

ートーコーN,N-ジメチルアミノエチルメタアクリレート) [90/5/5]。

(18)

ポリ(ステレン-コ-メタアクリル酸-ゴーダクリルアミド) [95/2/3]。

(19)

ポリ(ステレン-コ-N-メチロールアクリルアミド-コ-アクリル酸メトキシエチル) [95/5/5]。

(20)

ポリ(p-ビニルトルエン-コ-N-メチロールアクリルアミド-コ-アクリル酸) [90/8/2]。

(21)

ポリ(メチルメタアクリレート-コ-グリジルメタアクリレート-コ-ミ-ブチルアクリレート) [80/10/10]。

(22)

ポリ(ステレン-コ-p-ビニルベンジルクロリド-コ-アクリル酸-コ-アクリル酸ウレトイドエチル) [75/10/5/10]。

(23)

ポリ(ステレン-コ-メタアクリロレイン-コ-α-ヒドロキシエチルメタアクリレート) [90/5/5]。

(24)

ポリ(ステレン-コ-アクリロレイン-コ-アセトアセトキシエチルメタアクリレート) [85/5/10]。

(25)

ポリ(ステレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルアクリレート-コ-ビニルスルホニルエチルメタアクリレート) [90/5/5]。

(26)

ポリ(p-ビニルトルエン-コ-アミノステレン-コ-ビニルスルホニルエチルメタアクリレート) [85/10/5]。

(27)

ポリ(ステレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルメタアクリレート) [90/10]。

(28)

ポリ(ステレン-コ-アクリル酸) [97/3]

[92/8]

(29)

ポリ(ステレン-コ-アクリルアミド) [97/3]

[36]

(30)

ポリ(p-ビニルトルエン-コ-ミ-ブチルアクリレート) [95/5]

ポリ(メチルアクリレート-コ-ステレン-コ-アクリロレイン) [30/65/5]

[37]

ポリ(メチルアクリレート-コ-メタアクリルアミド) [95/5]

ポリ(メチルメタアクリレート-コ-ステレン-コ-2-ヒドロキシエチルメタアクリレート) [25/70/5]

(31)

[38]

ポリ(メチルアクリレート-コ-メタアクリルアミド) [95/5]

ポリ(ステレン-コ-ビニルスルホニルエチルアクリレート) [80/20]

(32)

[39]

ポリ(ステレン-コ-N-メチロールアクリルアミド) [95/5]

ポリ(ステレン-コ-N,N-ジメチルアミノエチルアクリレート) [90/10]

(33)

[40]

ポリ(p-ビニルベンジルクロリド-コ-N-メチロールアクリルアミド) [96/4]

ポリ(ステレン-メチルアクリレート-コ-アセトアセトキシエチルアクリレート) [90/5/5]

(34)

[41]

ポリ(ステレン-コ-イタコン酸) [98/2]

ポリ(ステレン-コ-メタアクリル酸) [9/5/5]

(35)

ポリ(ステレン-コ-ミ-ブチルアクリレート)

以下に本発明の例示化合物の合成例を示すが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

合成例-1

例示化合物(1)の合成

ステレン90部、グリシジルメタアクリレート10部、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレノニトリル)3部の単量体及び重合開始剤の混合物を上記単量体に対して3重量パーセントのリン酸三カルシウム、0.04重量パーセントのドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムからなる水溶液700ml中に、T.K.-ホモジエッター(特殊機化工業製)で5000rpmの搅拌速度で搅拌しながら添加した。添加後、約30分間搅拌し、顕微鏡で観察しながら、約20ミクロンの粒径になつた所で、通常の搅拌器(イカリ型)、冷却管、窒素ガス導入管及び温度計を付けた4頭フラスコに混合物を入れ、200rpmの搅拌速度に切り換えて、窒素ガス気流下、60°Cで8時間重合反応を行ない、反応を完結させた。次に内容物を室温まで冷却し、希炭酸水溶液にてリン酸三カルシウムを分

解除去し、水洗を繰り返えし行ない、重合体粒子を沪別、乾燥させて平均粒径18ミクロンの重合体粒子単位を得た。

合成例-2

例示化合物(3)の合成

ステレン75部、n-ブチルメタアクリレート15部、グリシジルメタアクリレート10部及び2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレノニトリル)3部の単量体及び重合開始剤の混合物を上記単量体に対して2重量パーセントのリン酸三カルシウム、0.02重量パーセントのドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムからなる水溶液700ml中にT.K.-ホモジエッターを用いて2000rpmの搅拌速度で搅拌しながら添加した。添加後、30分間、同搅拌速度で搅拌し、顕微鏡で観察し、単量体混合物の液滴が粒径約100ミクロンになつた所で、合成例-1と同様の反応及び操作を行ない、平均粒径100ミクロンの重合体粒子単位を得た。

合成例-3

例示化合物(39)の合成

ステレン97.5部、N,N-ジメチルアミノメチルメタアクリレート2.5部に2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレノニトリル)3部を溶解し、単量体混合物とした。次いで、上記単量体に対して3重量パーセントの親水性シリカーアエロジル200(テクサ社製)から成る水溶液700mlを調整し、上記水溶液をT.K.-ホモジエッターにより6000rpmの搅拌速度で搅拌しながら、上記単量体混合物を添加した。添加後、約30分間同搅拌速度で搅拌し、顕微鏡観察により、約20ミクロンの液滴に分散された所で、通常の搅拌装置(イカリ型)、冷却管、窒素ガス導入管及び温度計を付けた4頭フラスコに分散液を入れ窒素ガス気流下、250rpmの搅拌速度で、60°Cで8時間重合反応を行ない、反応を完結させた。次いで内容物を室温まで冷却し、希炭酸ナトリウム水溶液で洗い、次いで水洗を繰り返えし行ない、重合体を沪別、乾燥し平均粒径16.5ミクロンの重合体粒子単位を得た。

合成例-4

例示化合物(41)の合成

ステレン95部、メタアクリル酸5部に2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレノニトリル)3部を溶解し、単量体混合物とした。次いで上記単量体に対して3重量パーセントのアルミニウムオキシド(テクサ社製)から成る水溶液700mlを調製し、T.K.-ホモジエッターにより6000rpmの搅拌速度で上記水溶液を搅拌しながら上記単量体混合物を添加した。添加後、同搅拌速度で約30分間搅拌を行ない、顕微鏡観察で単量体混合物の液滴の粒径が約15ミクロンになつた所で、合成例-3と同様の反応及び操作を行ない、平均粒径16ミクロンの重合体粒子単位を得た。

上記の本発明に係る反応性基を含む熱安定性高分子重合体粒子単位は、典型的にはガラス転移温度(以下Tgと略す)が30°C以上、好ましくはTgが40°C以上である。本明細書でいうTgとは高分子重合体がガラス状態からゴム状態、又は流動性重合体へ状態変化する温度を意味し、熱安定性の指標となるものである。高分子重合体のTgは例

えば。Techniques and Methods of Polymer Evaluation 第1巻、Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1966)に記載の方法に従がい判定することができる。

本発明の粒子結合体構造層は、種々の方法を用いて製造することが可能である。好ましい方法の一つとして下記の工程を挙げることができる。

- (1) 本発明の反応性基を含む熱安定有機高分子重合体粒子単位を、該粒子を溶解しない液体キャリヤーに分散し、安定な分散液を調製し、
- (2) この安定な分散液に本発明の低分子化合物を加えた後、支持体に適用し、そして、
- (3) 該有機高分子重合体粒子単位の熱安定性温度より低い温度で、該粒子単位間の化学結合を起こさせながら液体キャリヤーを除去する。

「安定な分散液」とは、粒子単位同志が凝集塊を形成することなくキャリヤー中に存在することを意味する。粒子結合体構造層を製造するために有用な分散液は、同分散液を支持体上に適用するに十分な時間、安定である必要がある。

本発明の粒子単位は分散液の液体キャリヤーを除去する際に該粒子単位中に含まれる反応性基同志を化学結合させることで粒子結合体構造層を製造するものであるが、化学結合を起こさせる触媒、たとえば酸アルカリを分散液中に存在させることは有用である。特に、酸触媒のうち揮発性酸触媒（例えば、酢酸等）その他を用いることは有用である。又、液体キャリヤーを除去の操作は、有機高分子重合体粒子単位の熱安定性温度以下であることが望ましいが好ましくは10乃至70℃の温度により実施することができる。

前記分散液の液体キャリヤーは、水性液体とすることができる。しかしながら該粒子単位がキャリヤーに不溶性であり、従つてそれらの粒状特性が保持されるという条件下種々の有機液体のような他の液体キャリヤーも使用可能である。

水以外の代表的な液体キャリヤーには、水混和性有機溶媒、水と水混和性有機溶媒の水性混合物及び適当な水不混和性有機溶媒がある。水混和性有機溶媒には、低級アルコール（即ち、アルキル

このような安定な分散液を製造する為には、多くの方法を単独又は組合せて用いることが可能である。例えば有用な方法の一つとして、界面活性剤を液体キャリヤーへ添加し粒子単位の分散液中における分布及び安定化を促進することができる。

使用可能な代表的な界面活性剤の例としては、トライトン® X-100 (ロームアンドハース社製、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール) サーフアクタント10 G® (オリーン社製ノニルフェノキシポリグリシドール) 等の非イオン性界面活性剤がある。

上記界面活性剤は広範に選択された量を用いることが可能であるが、重合体粒子単位の重量に対して、10重量パーセント乃至、0.005重量パーセント、好ましくは6重量パーセント乃至、0.05重量パーセント用いる事ができる。更に別的方法として該粒子単位と液体キャリヤーの音波処理、物理的混合、及び物理的攪拌処理、pH調整がある。これらは前記の方法と組合わせることによりさらに有用である。

基の炭素数1乃至4個のアルコール)、アセトン及びテトラヒドロフランがある。水不混和性溶媒には、酢酸エチルの如き低級アルキルエステル、及びハロゲン化炭化水素（例えば、クロロホルム塩化メチル及び四塩化炭素等）の如きハロゲン化有機溶媒がある。

本発明の低分子化合物は、その性質が前記液体キャリヤーに溶解する場合には、そのまま溶解し、又そうでない場合、通常写真分野で用いられる分散法、例えば直接分散法、オイルプロテクト分散法等の慣用の方法で液体キャリヤー中に分散することができる。

本発明の粒子結合体構造層は一つ又はそれ以上の相互作用組成物を好都合に含むことができる。被検体又は被検体の反応生成物もしくは分解生成物と相互作用するか、又は粒子結合体構造層を組み込んだ分析板へ被検体含有液体試料を適用する際に、互いに相互作用する一つ又はそれ以上の活性成分が前記組成物に含まれる。このような相互作用により、予じめ形成した検出可能なスペシ

ーズの素子内での放出、検出可能なスペシーズの形成又は、素子内における検出可能な変化の生成が可能となる。

この「相互作用」という表現は、化学的活性、触媒活性(酵素-基質複合体形成)、免疫活性(抗原-抗体反応)及び任意の形態の電気的、化学的又は物理的相互作用を意味する。

これら電気的、化学的又は物理的相互作用により、素子内に検出可能な変化が放出、生成又は提供可能である。前記変化により所望の被検体又はその反応生成物、もしくは分解生成物の存在及び/又は、濃度が直接的にか又は間接的に示される。

生成する検出可能な変化は、放射測定により検出することが好ましい。放射測定とは、比色測定ケイ光測定、放射線計測及び、リン光測定、発光測定の如き電磁放射線測定方法を使用することによる検出をいう。

相互作用性組成物の存在可能な種々の成分には比色測定により検出可能な染料及び複合体；ケイ光測定により検出可能な染料、顔料及び、複合体；

発光タグ；放射性タグ；化学試薬；抗原；ハプテン；抗体及び抗原-抗体複合体のような免疫薬剤；酵素；並びに前記成分の前駆体及び反応生成物があることは自明である。

これら成分の使用に関する詳細は、米国特許第3992158号、ベルギー国特許第862955号、及び歐洲特許出願公開第0002963号に開示されている。

粒子結合体構造層内に相互作用性組成物が存在する場合、該層内で不動化し、該層内か又は該層を含む要素のその他の区域への不望の移動をできるだけ少なくするか又は防止することが可能である。不動化は通常、前記粒子へ物理的に吸着する方法や、化学的に結合する方法のような種々の手段により行なうことが可能である。

例えば、化学的に結合する方法において、本発明の前記粒子単位中に含まれる反応性基を含む単量体単位は有利に用いることが可能である。これは、相互作用性組成物と該粒子単位の結合部分での化学結合に関与しなかつたフリーの反応性基と

が化学的結合を起こせしめることにより容易に不動化される。他の場合では、相互作用性組成物の分子サイズ又は分子配列により特殊な物理吸着法又は、化学固定法を用いることなく、有効にある相互作用性組成物は粒子結合体構造層内に物理的に組込まれ、そしてその中に不動化される。

前記粒子結合体構造層を含む本発明の分析素子は配置のうち、任意の一つをとることが可能であり、一層以上の本発明の粒子結合体構造層を有してもよく、又、本発明の粒子結合体構造層と各種の機能層、試薬含有層、及び部材、例えば米国特許第3992158号記載の試薬層、沪過層、反射層、下塗り層、同第4042335号記載の放射線プロツキング層、同第4066403号記載のバイヤー層、同第4144306号記載のレジストレーション層、同第4166093号記載のマイクロレーション阻止層、同第4127499号記載のシンチレーション層、特開昭55-90859号記載の清掃層及び米国特許第4110079号記載の破壊性ポッド状部材等を任意に組合せて、本発明の目的に合せた分析素子を構成

することが可能である。

前記層の製造法及び前記層の本発明の分析素子への組み込み法は前記特許に記載の方法と同じであるか又は類似である。前記特許にはこのような層製造に必要可能な有用な材料についても記載されている。

反射層及び放射線プロツキング層又は本発明の素子に存在可能な反射層及び輻射線又は放射線プロツキング層を除いて、種々の層、支持体及び他の層を、輻射線又は放射線透過性^{*}とすることができる。この明細書において、輻射線又は放射線透過性^{*}という表現は、素子内で生成した分析的変化を検出する為に用いる電磁輻射線又は放射線の有効透過が可能である素子中の層、支持体及び材料を意味し、このような輻射層には、可視光線、螢光発光、放射線、X線等が含まれる。所定の場合の特定、輻射線又は放射線透過性^{*}材料の選択は用いる特定の輻射線又は放射線に依存する。当然のことながら輻射線透過性材料は本発明に必要ではない。種々の態様において輻射線プロツキ

ング剤か又は輻射線プロッキング層を用い、輻射線による、素子内で生じる化学的相互作用の妨害を防止可能である。

前述のごとく種々の層は互いに流体接触をする。この明細書では、流体接触」という表現により、使用条件下で一つの層から他の層へ流体(液状か又は気体状)が通過可能となるような様式で互いに協働する層が言及される。このような流体接触性能は、流体接触層間の接触界面に沿つて均一であるのが好ましい。流体接触層は隣接していてもよいが介在区域により離れていてもよい、しかしながらこのようない介在区域も流体接触し、そして流体の通過を妨げない。ある場合には素子内で最初離れて位置する区域を用いることが望ましい場合がある。このような場合、実質的に試料適用時に、例えば素子を圧縮することにより層の流体接触が行われる。

前述のごとく本発明の素子は支持体上に支持されることが可能である。有用な支持体材料には、酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート、

特開昭57-101760(11)

ポリカーボネート及びポリビニル化合物(例えばポリスチレン)のようなポリマー材料、ガラス、金属並びに紙がある。ある素子にとつて好ましい支持体とは結果検出の式と相容れるものである。

例えば素子内の螢光発光が素子内から支持体を通して外部検出器へ伝達される螢光測定検出では、低程度のバックグラウンドフルオロメトリー発光しか示さない材料を支持体材料として用いることが望ましい。

素子に、試薬層、反射又は輻射線プロッキング層及びレジストレーション層等のいずれかの層が存在する場合に前記層を、必ずしもそうではないが通常は支持体と本発明の粒子結合体構造層との間の素子中に介在させる。

本発明の分析素子製造において、個々の層を予備形成しその後使用に先だつてそれらを積層するか又は、素子使用時に流体接触するようになるまで別個の部材として保存可能である。別個の部材として予備形成した層は被覆可能であるならば、溶液又は分散液から有利に被覆することができ

る。前記層の被覆面は層が乾燥時に物理的にはがされうる表面である。しかしながら隣接層が望まれる場合、何回ものはがし工程及び積層工程を行なわねばならないという問題を回避可能である簡易方法は、最初の層をはがし、表面か又は支持体上に被覆し、所望ならそしてその後前記予備被覆層上に直接か又はそれらのそばに次の層を被覆して成る。

本発明の粒子結合体構造層を有する分析素子は、例えば浸漬塗布法、エアーナイフ法、カーテン塗布法又は米国特許第2681294号明細書に記載のごときポンパーを用いる押し出し塗布法等各種の塗布法で塗布することが可能であり、所望により、二層又はそれ以上の層を米国特許第2761791号及び英国特許第837095号明細書に記載の方法で同時に塗布することもできる。

本発明の分析素子は臨床化学の分野に用いられるのみならず、他の化学分析の分野においても適用可能であり又、一定表面積内に一定の流体を保持できる機能を用いて、他の機能層(例えば写真

要素の層)と組合せることも可能である。

本発明の分析素子は、血液、血清、リンパ液及び尿等の体液の臨床化学的分析に極めて有利である。特に血液分析の場合、通常血清を用いるが、本発明の分析素子の場合全血液、血清及び血漿のいずれかの分析にも不都合なく用いることができる。

全血液を用いる場合、必要に応じて検出のための輻射線が血球により妨害を受けるのをさける為に輻射線プロッキング層又は他の反射層を設けることができる。血球の色を直接観察する場合、たとえばヘモクロビン分析の如きものの場合は当然のことながら、上記反射層を設ける必要はない。

本発明の分析素子を用いて検出可能な変化として分析結果を得たのち、種々の検出可能な変化に対応して、反射スペクトロフォトメトリー、透過スペクトロフォトメトリー、発光スペクトロフォトメトリーもしくは螢光スペクトロフォトメトリー、又はシンチレーション測定等により測定される。このようにして得られた測定値は、あらかじ

め作製しておいた検量線に当てはめる事で、未知被検物質の量を決定することができる。

免疫分析は抗体及び抗原の定性分析又は定量分析として十分に認識されている方法である。すべての免疫分析法は、特異的な抗体が、特異的な抗原を認識しそれへ結合するという独特な免疫学的現象にもとづく。

これらの例として、例えば放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法等があげられる。

これらの測定法に用いられる抗体、抗原及びラベル抗原又はラベル抗体の調製法、測定方法及び測定原理等については成書に詳述されているが、例えば、入江実編集。ラジオイムノアッセイ。講談社(1974年)、石川栄治、河井忠、宮井潔編集。酵素免疫測定法。医学書院(1978)等があげられる。

前記測定を行うために通用している免疫分析方法では、下記に示す種々の欠点を有している。

(I) 典型的には10乃至200 μ lの流体試料を用いる慣用の化学分析又は血液分析と比較して、多

量(例えば0.1乃至1.0 ml)の流体試料が必要である。

(II) 試験混合物の特異的結合反応に多大の時間が必要である。(例えば数時間乃至1晩)

(III) 反応終了後に抗原-抗体結合複合体と未結合体の物理的分離が必要である。

(IV) 免疫分析反応を完了させるためには多くの工程が必要であり、又その工程は個々別々に行わねばならない。(例えば、試料添加、インキュベート、分離、ラベルの定量等の工程)が挙げられる。

しかしながら、本発明の分析素子に免疫分析を適用させることにより、多くの欠点が克服される。又、前記の抗原-抗体反応の基本的原理を用いた免疫分析以外に例えば、西ドイツ国特許公開公報第280145号に記載されているような抗原-抗体置換相互作用に基づく免疫分析も、本発明の分析素子に適用可能であることは自明である。

更にラベル抗原に対してある量の抗体を分析素子に組み入れそしてこの球体を不動化する。好ま

しくは、この不動化は粒子結合体構造層を有する素子の層内で行なう。粒子結合体構造の高分子重合体粒子単位の表面へ抗体を吸着させるか又は化学的に結合させることにより不動化を行うことができる。次いで未知の抗原の分析すべき流体試料をラベル抗原の存在下で素子と接触させる。ラベル抗原を、数あるうちで次のようないくつかの方法の一つにより免疫分析素子と協働させることができる。

即ち、①流体試料(未ラベル抗原を含む)へラベル抗原を直接添加し、次いでラベル抗原を含む流体試料を分析の為に免疫分析素子に通用する。②免疫分析素子へ、ラベル抗原及び流体試料を個別的に添加する(たとえば①流体試料添加の直前又は直後のラベル抗原の添加並びに②ラベル抗原を素子へ添加し、既いで乾燥しそして流体試料添加の際素子を再湿润させる)。③流体試料を半に通用することにより分析開始可能にするようにラベル抗原を免疫分析素子に組み入れる。たとえばラベル抗原を素子の単独試験層か又は不動化抗体

を含む素子の単独試験層に組み入れることができる。どの場合もラベル抗原を素子に組み入れる時は、ラベル抗原を不動化抗体と離して保持し、ラベル抗原の抗体への時期尚早の結合を回避するよう注意を払わねばならない。

前述のような協働ラベル抗原の存在下で流体試料を免疫分析素子と接触させる時、ラベル抗原及び未ラベル抗原(試料中に存在しそして測定すべき未知物である)は、素子の層内で不動化して存在する抗体へ競合結合する。未ラベル抗原の存在及び/又は濃度を決定する為の使用可能な有用な測定方法には次のようなものがある。(A) レジストレーション層のような素子の第二の層へ泳動した未結合ラベル抗原の検出。又は(B) 不動化抗体へ結合した結合ラベル抗体の検出。どちらの場合も流体試料中の未ラベル抗原(即ち被検体)の量は検出されたラベル抗原の濃度に基づき決定可能である。

以下、本発明を更に詳細に説明すべく実施例を示すが、本発明はこれらにより、何ら限定される

ものではない。

実施例-1

膜厚約180ミクロンの透明な下引き済みポリエチレンテレフタレート支持体上に、乾燥膜厚約20ミクロンの脱イオン化ゼラチンの層を塗布し、且つその上層に表-1-1に示す組成で本発明の粒子結合体構造層及び比較の多孔性展開層を設け、各々素子I, II, III, IV及び比較素子I, IIを形成した。

表-1-1

順	粒子結合体構造層及び多孔性展開層の組成
素子I	平均粒径約20ミクロンの本発明の例示化合物(1)からなる粒子単位15.0g/dm ² 及びエチレンジアミン0.01g/dm ² から成る乾燥膜厚280ミクロンの粒子結合体構造層
素子II	平均粒径18ミクロンの本発明の例示化合物(16)15.0g/dm ² 及びビスビニルスルホニルエーテル0.01g/dm ² から成る乾燥

膜厚280ミクロンの粒子結合体構造層	
素子III	平均粒径20ミクロンの本発明の例示化合物(17)15.0g/dm ² 及びグルタルアルデヒド0.01g/dm ² からなる乾燥膜厚280ミクロンの粒子結合体構造層
素子IV	平均粒径約20ミクロンの本発明の例示化合物(20)15.0g/dm ² 及びエピクロルヒドリン0.03gから成る、乾燥膜厚280ミクロンを有する粒子結合体構造層
比較素子I	二酸化チタン0.3g/dm ² 及び二酢酸セルロース0.037g/dm ² からなる米国特許第3992158号記載の、乾燥膜厚150ミクロンの多孔性展開層
比較素子II	平均粒径約20ミクロンの不活性ガラスピーズ6.5g/dm ² 及び脱イオン化ゼラチン0.13g/dm ² から成る、米国特許第3992158号記載の多孔性展開層

上記表-1-1に示した、本発明に係る素子及び比較素子に対して以下の試験を行つた。

即ち、5cmの長さのセロハンテープを上記素子及び比較素子の粒子結合体構造層及び多孔性展開層の上にはりつけ、その一端を持ち引きはがし、ハクリ強度を試験した。評価はハクリの度合から、

- 全くハクリしなかつたもの A
- セロハンテープをはつた半分 B
- 以下がハクリしたもの B
- セロハンテープをはつた部分 C
- 全体がハクリしたもの D
- セロハジテープをはつた部分 D
- 以上がハクリしたもの D

とした。

又、同様に素子及び比較素子の粒子結合体構造層及び多孔性展開層上に、人血清に対して赤色色素(Brilliant Scarlet 3R)を0.05重量パーセント添加し着色させた流体試料を10μl滴下し、流体試料の層内への収容時間及び層の形状変化について観察した結果は、表-1-2に示す

表-1-2

順	ハクリ試験	収容時間	層の形状変化
素子I	A	6(秒)	無
素子II	A	10	無
素子III	A	7	無
素子IV	A	11	無
比較素子I	D	36	無
比較素子II	C	58	滴下後10秒で層がくずれる

以上、表-1-2に示した結果の如く、比較素子I及びIIは、ともに機械的強度が脆弱であり特に比較素子IIの場合、流体試料の適用により多孔性展開層の構造を保つことができないが、流体試料を輸送する充分な機能をはたすことができないことがわかる。

一方、本発明の粒子結合体構造層を有する素子I乃至IVは、流体試料を輸送する相互連絡空隙を有し、且つその機械的強度は大であり、流体試料の層内への収容時間は著しく早いことが判る。

実施例-2

透明な膜厚180ミクロンの下引き挤みポリエチレンテレフタレート支持体上に下記の組成を含む、グルコース測定用の試薬層及び輻射線プロッキング層を順次塗布した。

(1)

グルコースオキシダーゼ	240u/dm ²
4-アミノアンチビリン塩酸塩	0.0086g/dm ²
1,7-ジヒドロキシナフタレン	0.0065g/dm ²
ペルオキシダーゼ	180u/dm ²
5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサジオン	0.0022g/dm ²
6-アミノ-4,5-ジヒドロキシ-2-メチルビリミジン	0.0002g/dm ²
3,3-ジメチルグルタル酸	0.0196g/dm ²
脱イオン化ゼラチン	0.196g/dm ²
を、5%水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH 8.0としたものからなるグルコース測定用試薬層。	

(2)

二酸化チタン	1.8g/dm ²
--------	----------------------

トリトンX-100

0.108g/dm²

(ロームアンドハース社製 オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)

ポリ(アクリルアミド-コ-エチルアクリロイルアセテート)

(重量比90/10) 0.108g/dm²

からなる輻射線プロッキング層。

このようにして作製したフィルム上に、下記組成の本発明の粒子結合体構造層及び多孔性展開層を積層し、各々本発明の分析素子I及び比較分析素子Iとした。

表-2

分析素子	粒子結合体構造層及び多孔性展開層の組成
本発明の分析素子I	平均粒径約20ミクロンの本発明の例示化合物(1)からなる粒子単位15.0g/dm ² 、エチレンジアミン0.01g/dm ² 及びサーフアクタント10G [®] (オリーン社製p-ノニルフェノオキシポリグリシドール)

0.3g/dm²から成る乾燥膜厚280ミクロンの粒子結合体構造層

比較分析素子I	二酸化チタン0.3g/dm ² 、及び二酢酸セルロース0.037g/dm ² 及びサーフアクタント10G [®] (同上)0.01g/dm ² から成る米国特許第3992158号記載の多孔性展開層
---------	--

次いでグルコース濃度0乃至400mg/dlの市販の血清検量溶液を上記素子上に10μlづつ滴下し37℃、10分間インキュベーションし、その後、試薬層に生成した色素を透明なポリエチレンテレフタレート支持体を通して反射濃度を測定し、検量線を作製した。

次いで種々の人血清試料及び人全血液試料(各々未知のグルコースレベルを含む)を各素子に10μlづつ滴下し、予め作製した検量線から各々のグルコース濃度を決定した。

又対照方法として、グルコースB-ラストワコー(和光純薬(株)製Trimder法によるグルコース

測定用キット)を用いて同様の試料中のグルコース濃度を測定した。

その結果、本発明の分析素子I及び比較分析素子Iとともに、人血清試料を適用した場合、共に対照方法により相関を示していたが、しかしながら人全血液試料を比較分析素子Iに適用した場合、全血液試料中の血球成分が多孔性展開層の空隙に詰りを生じさせ、その結果全血液試料中の血清の流れを阻害し、観測された分析値は対照方法の分析値に比較して相関を示さない異常値を示した。

一方、本発明の分析素子Iで同様の分析を行なつた結果、グルコース濃度は対照方法の値に対して良好な相関を示し、本発明の分析素子は全血液試料を用いることも可能であることが判る。

実施例-3

低レベルの螢光しか示さない、ポリスチレン支持体上に下記の組成からなる層を順次被覆した。

(1) 平均粒径8乃至10ミクロンの本発明の例示化合物(1)からなる高分子重合体粒子単位に正規ウサギ血清を吸着させたもの

4. $18/\text{dm}^2$
 エチレンジアミン $0.028/\text{dm}^2$
 非イオン性界面活性剤ゼオニル
 F S N (E. I. デュポン社製) $0.0168/\text{dm}^2$
 をリン酸緩衝剤で pH 7.2 に調製した後、上記組成で被覆された検出用粒子結合体構造層。

(2) 平均粒径 8 乃至 10 ミクロンの本発明の例示化合物(1)からなる高分子重合体粒子単位にウサギ抗 α -フェトプロテイン抗体を吸着させたもの

1.4 g/dm^2
 エチレンジアミン $0.018/\text{dm}^2$
 非イオン性界面活性剤ゼオニル
 F S N (E. I. デュポン社製) $0.0148/\text{dm}^2$
 をリン酸緩衝剤で pH 7.2 に調製した後、上記組成で被覆した相互作用性組成物含有粒子結合体構造層。

上記により製造された本発明の α -フェトプロテイン分析用の免疫分析素子に対して、以下の試験血清を適用した。即ち、正常成人血清からイムノアドソルベントを用いて α -フェトプロテイン

を除いた血清 $10 \mu\text{l}$ に対して、ラベル抗原として螢光ラベル α -フェトプロテイン 5×10^{-6} モル及び未ラベル抗原として 0 乃至 1×10^{-6} モルに亘る種々の α -フェトプロテインを含む試験血清を用意し、各々を $10 \mu\text{l}$ づつ上記本発明の免疫分析素子上に滴下した。

$10 \mu\text{l}$ の試験血清は、全て、15秒以内に相互作用性組成物含有粒子結合体構造層内へ吸収された。この後、上記素子を 37°C 、20分間インキュベートした。次いで各々の素子を 490 nm 及び 515 nm に励起フィルター及び発光フィルターを有する反射螢光光度計を用いて、ポリスチレン支持体を通して、未結合ラベル α -フェトプロテインの螢光強度を測定した。結果は表-3 に示す。

表-3

試験血清中の α -フェトプロテイン濃度	測定螢光強度 (但し、任意単位)
0	360
2×10^{-6} モル	372
6×10^{-6} モル	440
1×10^{-5} モル	469
1×10^{-6} モル	533
1×10^{-6} モル	576
リン酸緩衝液によるブランク	45

以上、表-3 に示した如く、本発明の免疫分析素子は試験血清中に含まれる種々の濃度の未ラベル α -フェトプロテインに対応した螢光を測定することにより迅速に免疫分析することが可能である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の反応性基を含む熱安定性高分子重合体粒子単位からなる粒子結合体構造層の部

分構造を示した説明図である。

- 1 ……粒子結合体構造層の部分構造
- 2 ……熱安定性高分子重合体粒子単位
- 3 ……低分子化合物を介した化学結合部
- 4 ……相互連絡空隙

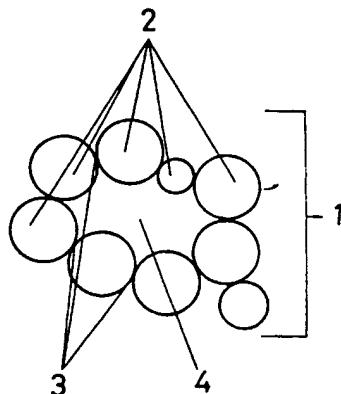
代理人 桑原義美

手続補正書

昭和56年4月27日

図面の添書(内容に変更なし)

第1図



特許庁長官 島田春樹 殿

1. 事件の表示

昭和55年特許願第 179613号

2. 発明の名称

分析案子

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

名称 (127) 小西六写真工業株式会社

代表取締役 岩岡 弘
川本信彦3
4
5
6

4. 代理人

〒191
居所 東京都日野市さくら町1番地

小西六写真工業株式会社内

氏名 桑原義美

特許庁
56.4.30
出願第二部
付

5. 補正命令の日付 昭和56年3月31日(発送日)

6. 補正の対象 明細書および図面

7. 補正の内容 明細書および図面の添書(内容に変更なし)

手続補正書

昭和56年11月18日

特許庁長官 島田春樹 殿

1. 事件の表示

昭和55年特許願第 179613号

2. 発明の名称

分析案子

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

名称 (127) 小西六写真工業株式会社

代表取締役 岩岡 弘
川本信彦

4. 代理人

〒191
居所 東京都日野市さくら町1番地

6. 補正の対象

昭和56年4月27日付手続補正書にて補正(タイプ添書)した明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

明細書の第15頁第7行目の「有する。」を「有する単量体としては、例えば2-(ビニルスルホニルアミノ)エチルメタクリレート、ビニルスルホニルメチルステレン等が挙げられる。」と補正する。

5. 補正命令の日付

自発

55.11.20
付

手続補正

昭和57年3月12日

特許庁長官 島田春樹殿

1. 事件の表示

昭和55年特許願第 179613号

2. 発明の名称

分析素子

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

名称 (127) 小西六写真工業株式会社

代表取締役 堀岡弘
川本信彦

3字簡略表示
特許出願人

4. 代理人

甲 191
居所 東京都日野市さくら町1番地

小西六写真工業株式会社内

氏名 桑原義美

特許出願人
57.3.15
出願第二課
小原

5. 補正命令の日付

自発

特開昭57-101760(17)

6. 補正の対象

明細の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

発明の詳細な説明を次の如く補正する。

(昭和56年4月27日差出手続補正の明細の
頁及び行による。)

頁	行	補正前	補正後
4	1	三つの機能を	三つの機能を
4	12	現像	現象
4	下から4	粒状物質水性液体試料	粒状物質は水性液体試料
15	7	有する。	有する基團としては、 例えば2-(ビニルスル ホニアミノ)エチルメ ターアクリレート、ビニル スルホニルメチルスチレ ン。
18	12	(I) $\text{CH}_2=\text{CR}'-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^2$	(I) $\text{CH}_2=\text{CR}'-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^2$
19	5	式中R', R ² は ビニルベンジルクロリ ド、	式中R', R ² は ビニルベンジルクロリド、
29	6	(テグサ社製)	(テグサ社製)

30	6	ド(テグサ社製)	ドC(テグサ社製)
	7	ホモジッター	ホモジッター
44	下から1	球体	抗体
55	9	抗 α -フェトプロテイン 抗体	抗ヒト α -1-フェトプロテイン抗体
55	下から4		
	下から1		
56	2,4,13	α -フェトプロテイン	α -1-フェトプロテイン
57	表-3中		
	下から6		

○ 第39頁第3行目の「防止可能である。」の次に以下の文を挿入する。

「このような輻射線プロッキング剤は、公知の種々の化合物を本発明の高分子、重合体粒子単位内に含有することは可能である。例えば可視光線の為の輻射線プロッキング剤としては、二酸化チタン、硫酸バリウム等の白色顔料が用いる事が出来る。又蛍光分析の為には蛍光スペシーズの特性によって選択された顔料又は染料が用いられる。代表的な顔料又は染料の一部として、例えばウォ

ットン (Wachtung) レッドB ピグメント[®] (E I デニポン ネモアース社)、リーガル 300[®] (カボット社) バーマネントバーブル[®] (GAF社) ベリオファーストブルー[®] (BASF社)、ソルファーストメチルバイオレット (ジャーウインウイリアムス社) 等が挙げられる。又、放射線スペシーズ、に対しては公知の無機化合物等が用いる事が出来る。

このような輻射線プロッキング剤は、本発明の高分子粒重合体粒子単位の0.5乃至60重量%を含有する事が可能である。」

○ 第40頁下から第1行目の「測定される。」の次に以下の文を挿入する。

「上記の分光学的測定方法は当然の事ながらその用いられる検出反応に対応して、終点測定法 (End-point assay エンドポイントアッセイ) 及び初速度法 (rate assay レートアッセイ) を用いる事が出来る。又、蛍光スペクトルホトメトリー (場合によっては発光スペクトルホトメトリー)においては定常光測定及び時間分解測定を用いる事が出来る。これら測定法の選択は用いられる蛍光タグによって選択されるものである。」